

12

**EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

21 Anmeldenummer: 84114247.4

51 Int. Cl.<sup>4</sup>: **C 12 Q 1/56**

**C 12 Q 1/38, G 01 N 33/86**

22 Anmeldetag: 26.11.84

**C 12 Q 1/44, A 61 K 35/50**

43 Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
**04.06.86 Patentblatt 86/23**

84 Benannte Vertragsstaaten:  
**AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE**

71 Anmelder: **AMERICAN HOSPITAL SUPPLY  
CORPORATION**  
**One American Plaza**  
**Evanston, IL 60201(US)**

72 Erfinder:  
**Die Erfinder haben auf ihre Nennung verzichtet**

74 Vertreter: **Brose, D. Karl, Dipl.-Ing. et al,**  
**Patentanwälte Brose & Partner Wiener Strasse 2**  
**D-8023 München-Pullach(DE)**

54 **Koaktivator zur Aktivierung von Protein C.**

67 Es wird ein Koaktivator beschrieben, mit dem die  
Bestimmung von Protein C in menschlichem Plasma schnell  
und einfach durchführbar ist.

1

Koaktivator zur Aktivierung von Protein C

5

Die Erfindung bezieht sich auf einen Koaktivator zur Aktivierung von Human-Protein C in Gegenwart von Calciumionen.

10

Die Haemostase wird durch zwei Hauptmechanismen kontrolliert, nämlich einerseits die Gerinnung, welche das Entstehen eines Gerinnsels reguliert, und andererseits durch die Fibrinolyse, welche für die Regulation des Gerinnselabbaus verantwortlich ist.

15

Die Gerinnung verläuft nach einer Kaskadenreaktion, bei der durch sukzessive Aktivierung (Teilproteolyse) von im Blut zirkulierenden Gerinnungsfaktoren (Proteine) Thrombin gebildet wird, welches Fibrinogen in unlösliches Fibrin umwandelt.

20

Von den bekannten Mechanismen zur physiologischen Regulierung der Gerinnung kommt den beiden folgenden besondere Bedeutung zu:

25

i) Durch Antithrombin III wird der Thrombin-Heparin-Komplex an die Oberfläche der Endothelialzellen gebunden, wodurch das Thrombin inhibiert und damit die Gerinnselbildung verhindert wird.

30

ii) Protein C wird durch Thrombin zu aktiviertem Protein C (PCa) übergeführt, das als Serinprotease wirkt, welche die für die Gerinnung erforderlichen Faktoren V und VIII in aktivierter Form (Va und VIIla) abbaut, wodurch die Gerinnselbildung inhibiert oder verzögert wird.

35

- 1 Protein C ist ein Vitamin K abhängiges Plasmaprotein mit einem Molekulargewicht von 62 000. Zum Aufbau und zur Funktion von Protein C ist auf folgende Literaturstellen hinzuweisen: Kisiel, W.: J. Clin. Invest. 64, 5 761-769 (1979); Sala, N., Owen, W. G., Collen, B.: Blood 63, 671-675 (1984); Cazenave, J. P., Wiesel, M.-L., Grunebaum, L., Freyssinet, J.-M., Dorner, M., Fritsché, R., Greber, S., Spaethe, R., Lampart, A.: VIIIth International Congress on Thrombosis, Istanbul (1984); Freyssinet, J.M., 10 Grunebaum, L., Wiesel, M. L., Fritsché, R., Greber, S., Lampart, A.: Titisee Meeting on Protein C (1984); Esmon, C. T., Esmon, N. L.: Semin. Thromb. Hemostas. 10, 122-130 (1984); Salem, H. H. Broze, G. J., Miletich, J. P., Magerus, P. W.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 15 1584-1588 (1983); Griffin, J. H.: Semin. Thromb. Hemostas. 10, 162-166 (1984); Bertina, R. M., Broeckmans, A. W., Krommenhoeck-van, E., van Wijngarden, A.: Thromb. Haemostas. 51, 1-5 (1984); Walker, F. J.: Thrombosis Research 22, 321-27 (1981).

20

Es wurde festgestellt, daß zur Umwandlung von Protein C zu aktiviertem Protein C, durch Thrombin in Gegenwart von Calciumionen in physiologischen Konzentrationen, Koaktivatoren erforderlich sind. Bisher sind zwei Koaktivatoren bekannt, und zwar sogenanntes Thrombomodulin, das aus Kaninchen - oder Rattenlunge gewonnen wird (Esmon, Charles T. Contemporary Hematology/Oncology, 1984, Seiten 137 - 25 154), sowie der Faktor Va (Salem, H. H. Broze, G. J., Miletich, J. P., Magerus, P. W.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 1584-1588, 1983).

35

- 1 Weiterhin haben klinische Studien gezeigt, daß Familien  
mit häufigen Thrombosefällen einen angeborenen Mangel  
an Protein C aufweisen können (Griffin, H. H.: Semin.  
Thromb. Hemostas, 10, 162 - 166, 1984). Der Protein  
5 C-Gehalt im Plasma scheint neben der Thrombosedagnostik  
jedoch auch in anderen klinischen Fällen wichtig zu  
sein, z. B. für die disseminierte intravaskuläre Gerin-  
nung.
- 10 Es ist bekannt, den Protein C-Gehalt im menschlichen  
Plasma durch die Laurell-Rocket-Immunelektrophorese  
mit einem Anti-Protein C-Antiserum zu ermitteln (Esmon,  
Charles T., Contemporary Hematology/Oncology, 1984,  
Seite 137 ff.). Dabei kann jedoch nur der Gesamtgehalt  
15 des Protein C ermittelt werden, nicht jedoch dessen  
biologische Aktivität, auf die es bei der Diagnose  
aber vor allem ankommt.
- Auch sind bereits Funktionstests für Human-Protein  
20 C bekannt, also Methoden zur Bestimmung der biologischen  
Aktivität von Protein C (Sala, N., Owen, W.G., Broeck-  
manns, A. W., Krommenhoeck-van, E., van Wijngarden,  
A.: Thromb. Haemostas. 51, 1-5; 1984).
- 25 Diese Tests benötigen aber große Mengen an kostspieli-  
gen Reagenzien (humanes  $\alpha$ -Thrombin, Antithrombin III,  
Heparin, Hirudin, hochgereinigtes Kaninchen Thrombomodu-  
lin) und sind nur in einer Gesamtdauer von mindestens  
6 Stunden durchführbar.
- 30 Es besteht daher ein großes Bedürfnis nach einer Bestim-  
mungsmethode, insbesondere einem Funktionstest für  
Protein C in menschlichem Plasma, der mit routinemäßiger  
Analyse schnell, genau und mit geringem Kostenaufwand  
35 durchführbar ist.

1 Durch die Erfindung wird ein Koaktivator zur Aktivierung  
von Human-Protein C in Gegenwart von Calciumionen  
bereitgestellt, der im wesentlichen nach den im Anspruch  
1 angegebenen Verfahrensschritten erhältlich ist.

5 Dieser Koaktivator (Extrakt) ist billig und ermöglicht  
die Durchführung des Funktionstests in ungefähr 2 Stunden.  
Die zusätzlichen Reagenzien ( $\alpha$ -Thrombin, Hirudin)  
werden außerdem in kleinen Mengen eingesetzt.

10 Es wurde festgestellt, daß der erfindungsgemäße Koakti-  
vator einen Glyco-Proto-Lipid-Komplex der Zellmembran  
mit einem Molekulargewicht von 40 bis 100 000 Daltons  
darstellt.

15 Wird der erfindungsgemäße Koaktivator einer menschlichen  
Plasmaprobe zugegeben, so wird das Protein C rasch  
in aktiviertes Protein C umgewandelt. Das aktivierte  
Protein C (PCa) kann dann mit einem chromogenen Substrat-  
20 Verfahren bestimmt werden.

Durch den erfindungsgemäßen Koaktivator wird damit  
die Möglichkeit geschaffen, einen Protein C-Funktions-  
test als einfachen Routinetest durchzuführen.

25 Auch kann dieser Routinetest problemlos automatisiert  
werden. Als frisches menschliches Organ kommt in erster  
Linie die Placenta in Frage. Daneben ist auch die Ver-  
wendung von Lunge, Gehirn, Nieren und Leber denkbar.  
Ebenso sind Zellkulturen, insbesondere endotheliale  
30 Zellkulturen als Ausgangsmaterial zur Herstellung des  
erfindungsgemäßen Kofaktors geeignet.

35

- 1 Der erfindungsgemäße Funktionstest für Protein C im  
menschlichen Plasma kann qualitativ, halbqualitativ,  
quantitativ oder nach einem Screening-Verfahren durch-  
geführt werden. Statt einem chromogenen Substrat kann  
5 auch ein fluorogenes oder lumineszentes Substrat zur  
Bestimmung der amidolytischen Aktivität des aktivierten  
Protein C verwendet werden.

- Neben der Bestimmung des Protein C-Gehalts aufgrund der  
10 amidolytischen Aktivität kann der Funktionstest auch  
nach einer Gerinnungsmethode durchgeführt werden. Das  
heißt, der Protein C-Gehalt wird anhand der Zeitdifferenz  
zwischen der aktivierten partiellen Thromoplastinzeit  
mit und ohne Koaktivator ermittelt.

- 15 Die nachstehenden Beispiele dienen der weiteren Erläu-  
terung der Erfindung.

#### 20 Beispiel 1

Dieses Beispiel bezieht sich auf die Extraktion des er-  
findungsgemäßen Koaktivators aus Placenta.

- 25 Frische Humanplacenta wird zerkleinert und mehrfach mit  
physiologischer Kochsalzlösung (0,9 Gew.-%) gewaschen.  
Danach wird einmal mit TRIS-HCl-Puffer (0,02 - 0,15 M),  
der Saccharose (0,05 - 0,3 M), Benzamidin (0,1 - 10 mM),  
Phenyl-methylsulfonyl-fluorid (0,1 - 2 mM) und  $\text{NaN}_3$   
30 (0,01 - 0,02 Gew.-%) enthält, gewaschen. Das Material  
wird anschließend auf -50 bis -80 °C tiefgefroren. Das  
aufgetaute Material wird homogenisiert und mit dem glei-  
chen TRIS-Puffer gewaschen und anschließend bei  
20 000 g 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Präzipitat  
wird anschließend 1 bis 18 h bei pH 7,0 bis 8,0 mit  
35 einem TRIS-HCl-Puffer (20 bis 150 mM) der Saccharose  
(0,05 bis 0,3 M), Benzamidin (0,1 bis 10 mM),  $\text{NaN}_3$   
(0,01 bis 0,02 Gew.-%) und ein Detergenz (0,01 - 2 Gew.-%)

1 enthält, extrahiert. Als Detergenz können Triton X-100,  
LAPAO (Lauryl-amido-propyl-N,N-dimethylamin-oxid),  
Tween 20, 40, 60 oder 80, Gallensäuren (Cholate), Alkyl  
(n = 5-15)- Glyco- (oder Manno)-Pyranoside, NP 40,  
5 LUBROL PX (Ethylenoxid-Kondensat von Fettalkoholen),  
CHAPS (3-(3-Cholamidopropyl) dimethylaminio-3-propansul-  
fat) oder STEROX (ethoxylierter Thioether) verwendet  
werden. Nach dem Zentrifugieren bei 30 000 g 30 min.  
bei 4 °C wird der Überstand mit mehreren Filtern (z.  
10 B. 3 µm, 1,2 µm, 0,8 µm und 0,4 µm) filtriert und an-  
schließend konzentriert. Das Filtrat wird anschließend  
mit Phospholipase A<sub>2</sub> (0,001 Einheiten/ml - 3 Einheiten  
/ml) aus Säugetier-Pancrease 10 min bis 10 h in Gegen-  
wart von Calcium (5 mM) bei 22 bis 37 °C behandelt.

15

Der so gewonne Placenta-Extrakt wird durch Chromatographie mit  
DEAE-Sephacel weiter gereinigt. Der Protein C-Koaktiva-  
tor wird dadurch von einer kontaminierenden amidolyti-  
schen Aktivität befreit, d. h. einer Aktivität, die  
20 den Funktionstest anhand der amidolytischen Aktivität  
beeinträchtigen würde. Eine Analyse auf SDS-PAGE des  
gereinigten Materials zeigte ein Protein-Band mit einer  
Verteilung zwischen 40 000 und 100 000 Daltons.

## 25 Beispiel 2

In diesem Beispiel wird die Extraktion des Protein  
C-Koaktivators unter spezifischer Verwendung von Tri-  
ton X-100 beschrieben.

30

100 g frische Humanplazenta wurden zerkleinert und  
fünfmal mit einem Liter einer 0,9-gewichtsprozentigen  
wässrigen NaCl-Lösung in Gegenwart von 1 mM Phenylmethyl-  
sulfonylfluorid gewaschen. Anschließend wurde mit 2  
35 Liter TRIS-HCl-Puffer (20 mM, pH 7,5), der 0,25 M  
Saccharose, 1 mM Benzamidin, 1 mM Phenylmethylsulfonyl-  
fluorid und 0,01 % (G/V) NaN<sub>3</sub> enthielt, gewaschen.  
Das Material wurde tiefgefroren und bei minus 70°C aufbewahrt.

1 Nach dem Auftauen wurde das Material mit einem elektri-  
schen Gerät 3 Minuten lang homogenisiert. Danach wurde  
1 Liter des oben erwähnten TRIS-HCl-Puffers hinzugegeben  
und anschließend fünfmal mit einem Liter dieses Puffers  
5 bei Raumtemperatur und unter Rühren gewaschen. Das  
Homogenat wurde mit 20000 g bei 4°C 30 Minuten lang  
zentrifugiert. Der Niederschlag wurde dann mit 30 ml  
TRIS-HCl-Puffer (20 mM , pH 7,5), der 0,25 M Saccharose,  
1 mM Benzamidin, 0,01 % (G/V)  $\text{NaN}_3$  und 0,5 (V/V) Triton  
10 X-100 enthielt, extrahiert. Diese Extraktion wurde  
2 Stunden lang durchgeführt. Nach dem Zentrifugieren  
mit 30000 g bei 4°C 30 Minuten lang wurde der Überstand  
nacheinander durch Millipore-Membranen mit 3  $\mu\text{m}$ , 1,2  
 $\mu\text{m}$ , 4  $\mu\text{m}$ , 1,2  $\mu\text{m}$ , 0,8  $\mu\text{m}$  und 0,4  $\mu\text{m}$  filtiert und schließ-  
15 lich fünfmal mit einem Amicon-Gerät unter Verwendung  
von PM-10 Membranen konzentriert. Das Filtrat wird wie  
im Beispiel 1 mit Phospholipase  $\text{A}_2$  behandelt.

### Beispiel 3

20

Dieses Beispiel beschreibt die Extraktion des Protein  
C-Koaktivators unter spezifischer Verwendung von  
Beta-D-octyl-glycosid.

25

Es wurde so vorgegangen wie im Beispiel 2, jedoch  
anstelle von Triton-X-100, Beta-D-octyl-glycosid  
mit einer Endkonzentration von 1 % (Gew/V) verwendet.  
Dieses Detergenz kann aus einem Gemisch nach der Ex-  
30 traktion leicht entfernt werden.

30

35

1

Beispiel 4

5 Nach diesem Beispiel wird die biologische Aktivität des Koaktivators bestimmt, und zwar anhand dessen Fähigkeit, die Aktivierung von Protein C zu aktiviertem Protein C (PCa) durch Thrombin in Gegenwart von Calcium zu stimulieren.

10

Die Aktivierung wird in einem TRIS-HCl-Puffer (0,05 M, pH 7,5), der 0,1 M NaCl, 0,01 Gew.-%  $\text{NaN}_3$ , 5 mM  $\text{CaCl}_2$  und 50  $\mu\text{g/ml}$  Human-Albumin enthält, durchgeführt. Die Reagenz-Mischung enthält dabei bei einem Gesamtvolumen von 200  $\mu\text{l}$  1 bis 5  $\mu\text{g/ml}$  Thrombin, 50  $\mu\text{g/ml}$  Protein C und verdünnten Koaktivator und wird 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wird mit einem Überschuß an Thrombin-Inhibitor (beispielsweise Hirudin,  $\alpha$ -NAPAP, Antithrombin III und Heparin) gestoppt. Die Menge an aktiviertem Protein C (PCa) wird photometrisch, beispielsweise nach einem chromogenen, fluorogenen oder luminiphoren Substrat test gemessen. (z. B. Spaltet PCa das Chromogen-Substrat S 2238 und der somit freigesetzte para-Nitroanilin-Chromophor kann bei 405 nm photometrisch bestimmt werden).

25

Beispiel 5

30

In diesem Beispiel wird ein Funktionstest zur Bestimmung der biologischen Aktivität des Protein C beschrieben. Dieser Test basiert auf der Fähigkeit des Koaktivators, die Umwandlung von Protein C zu aktiviertem PC (PCa) durch Thrombin in Gegenwart von Calcium zu stimulieren.

35

Der Test wird folgendermaßen durchgeführt:

1 1 ml Plasma (Probe, deren Protein C-Gehalt bestimmt  
werden soll)  
+ 60 µl  $\text{BaCl}_2$  1 M

5 werden 20 min bei 4°C gerührt und anschließend zentri-  
fugiert. Der Niederschlag wird zweimal mit 1 ml Imida-  
zol-(20 mM) Puffer, pH 6,0, der Benzamidine (10 mM)  
und NaCl (0,2 M) enthält, gewaschen.

10 Der gewaschene Niederschlag wird anschließend in 0,5  
ml MES (2-N-Morpholino-ethansulfonic-acid) Puffer,  
pH 6,0, der 0,23 M Na-Citrat enthält, wieder aufge-  
löst. Durch Zugabe von Poly-ethylen-glycol werden  
alle Proteine, und dadurch auch Protein C, wieder  
15 präzipitiert. Nach Zentrifugation wird der Niederschlag  
in 200 µl TRIS (50 mM)-NaCl (0,1 M)-Puffer, pH 7,5,  
resuspendiert und  $\text{CaCl}_2$  (5 mM), Thrombin (0,5 Einheiten)  
sowie 50 µl Koaktivatorlösung werden dazugemischt  
(Totalvolumen 300 µl). Das Gemisch wird 30 min bei  
20 37°C inkubiert und die Reaktion danach mit 5 Einheiten  
(ATU) Hirudin gestoppt.

Das dermaßen aktivierte PC (PCa) wird durch Zusatz  
eines chromogenen Substrats photometrisch oder durch  
die APTT-Verlängerung (APTT = aktivierte partielle  
25 Thromboplastinzeit) gemessen.

#### a) Chromogenische Substrat Messung

300 µl der PCa-Lösung  
+ 650 µl des oben erwähnten TRIS-NaCl Puffers  
30 + 50 µl Chromogenes Substrat (S2238 oder S2266)  
werden gemischt und die OD/min gemessen.

#### b) APTT-Verlängerung

100 µl der PCa-Lösung  
35 + 100 µl Actin  
werden in 100 µl  $\text{CaCl}_2$  vermischt und die APTT gemessen.

Als Kontrollen werden gereinigtes Protein C und Protein  
C-Mangelplasma benützt.

0182929

KARL A. BROSE †1981  
Dipl.-Ing.  
D. KARL BROSE  
Dipl.-Ing., Dipl.-Wirtsch.-Ing.  
MICHAEL RESCH  
Dipl.-Phys.

- 1 -

American Hospital Supply Corporation  
One American Plaza, Evanston, Ill. USA 60201

Ihre Zeichen:  
Your ref:

Tag: 26. November 1984  
Date:

## Koaktivator zur Aktivierung von Protein C

### A n s p r ü c h e

1. Koaktivator zur Aktivierung von Human-Protein C in Gegenwart von Calciumionen, erhältlich durch folgende Verfahrensschritte:

- 5 a) Ein zerkleinertes frisches menschliches Organ  
oder eine menschliche Zellkultur wird mit einem  
TRIS-HCl-Puffer, der Saccharose (0,05 - 0,3 M),  
Benzamidin (0,1 - 10 mM), Phenyl-methylsulfonyl-  
fluorid (0,1 - 10 m) und  $\text{NaN}_3$  (0,01 Gew.-%) ent-  
10 hält, gewaschen und anschließend tiefgefroren.

1        b) Aus dem tiefgefrorenen Material wird nach dem  
         Auftauen in dem gleichen Puffer wie unter a) ein  
         Homogenat hergestellt und anschließend mit dem  
         gleichen Puffer wie unter a), jedoch mit einem  
5        Zusatz von 0,005 bis 5 Gew.-% Detergenz extrahiert.

         c) Der Extrakt wird filtriert.

2. Koaktivator nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,  
10        daß zur Beseitigung einer Thromboplastin-Aktivität  
         der Extrakt nach dem Filtrieren einer Behandlung mit  
         Phospholipase A<sub>2</sub> unterworfen wird.

3. Koaktivator nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekenn-  
15        zeichnet, daß als menschliches Organ Placenta verwen-  
         det wird.

4. Koaktivator nach einem der vorstehenden Ansprüche,  
         dadurch gekennzeichnet, daß als Detergenz Triton X-100,  
20        Tween 20-40-60-80, Cholate, Alkyl-glyco- oder -manno-  
         pyranoside, LAPAO, NP-40, Lulepal PX, Lubrol PX,  
         CHAPS oder Sterox verwendet wird.

5. Koaktivator nach einem der vorstehenden Ansprüche,  
25        dadurch gekennzeichnet, daß der Extrakt nach dem  
         Filtrieren einer Reinigung  
         unterworfen wird.

6. Koaktivator nach einem der vorstehenden Ansprüche,  
30        dadurch gekennzeichnet, daß er zur Stabilisierung  
         einem physikalischen Verfahren unterworfen wird und/oder ihm  
         antimikrobiologische Mittel und/oder NaN<sub>3</sub> zugesetzt  
         wird.

35        7. Verfahren zur Bestimmung des Protein C-Gehalts im  
         menschlichen Plasma, dadurch gekennzeichnet, daß der  
         Probe ein Koaktivator nach einem der vorstehenden  
         Ansprüche zur Umwandlung des Protein C in aktiviertes

1 Protein C zugesetzt wird.

5 8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet,  
daß der Gehalt des aktivierten Protein C in einem  
Funktionstest nach einer Gerinnungsmethode oder  
aufgrund seiner amidolytischen Aktivität bestimmt  
wird.

10 9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet,  
daß die amidolytische Aktivität durch Spaltung  
eines Peptids mit nach der Spaltung analytisch  
genau und leicht erfaßbarer Indikator-Gruppe erfolgt

15 10. Diagnostische Reagenz zur Durchführung des Verfah-  
rens nach einem der Ansprüche 7 bis 9, enthaltend  
Koaktivator nach einem der Ansprüche 1 bis 6.

20 11. Therapeutisches Mittel; enthaltend Koaktivator  
nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Behandlung  
von Gerinnungsdefekten.

12. Mittel nach Anspruch 11 zur Behandlung von Thrombose.

25 13. Ausrüstung (kit of parts), enthaltend Koaktivator  
nach einem der Ansprüche 1 bis 6 sowie Thrombin  
Inhibitor.

30

35



| EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                |                                           |                                                                           |                                    |                                                                                                     |                                                |                                           |                                                                                                   |                                             |                                 |  |                                   |  |                       |                                                                     |                                                              |  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|-------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------|--|-----------------------------------|--|-----------------------|---------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|--|
| Kategorie                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile                                                                                                                                                                            | Betrifft Anspruch                         | KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl. 4)                                 |                                    |                                                                                                     |                                                |                                           |                                                                                                   |                                             |                                 |  |                                   |  |                       |                                                                     |                                                              |  |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | CHEMICAL ABSTRACTS, Band 101, Nr. 23, 3. Dezember 1984, Seite 246, Nr. 206334z, Columbus, Ohio, US; H.H. SALEM u.a.: "Isolation and characterization of thrombomodulin from human placenta" & J. BIOL. CHEM. 1984, 259(19), 12246-12251<br>* Zusammenfassung * | 1,3-5, 7,9                                | C 12 Q 1/56<br>C 12 Q 1/38<br>G 01 N 33/86<br>C 12 Q 1/44<br>A 61 K 35/50 |                                    |                                                                                                     |                                                |                                           |                                                                                                   |                                             |                                 |  |                                   |  |                       |                                                                     |                                                              |  |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | ---<br>BIOLOGICAL ABSTRACTS, Band 77, Nr. 9, 1984, Seite 7137, Nr. 64891, Philadelphia, US; R.B. FRANCIS Jr. u.a.: "A functional assay for protein C in human plasma" & THROMB. RES., 32(6), 605-614, 1983<br>* Zusammenfassng *                               | 7,8                                       |                                                                           |                                    |                                                                                                     |                                                |                                           |                                                                                                   |                                             |                                 |  |                                   |  |                       |                                                                     |                                                              |  |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | ---<br>US-A-4 214 049 (B.T. AF EKENSTAM u.a.)<br>* Insgesamt *                                                                                                                                                                                                 | 7-9                                       | RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl. 4)<br><br>G 01 N<br>C 12 Q<br>A 61 K  |                                    |                                                                                                     |                                                |                                           |                                                                                                   |                                             |                                 |  |                                   |  |                       |                                                                     |                                                              |  |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | ---<br>CHEMICAL ABSTRACTS, Band 100, Nr. 19, 7. Mai 1984, Seite 216, Nr. 152824t, Columbus, Ohio, US; N. SALA u.a.: "A functional assay of protein C in human plasma" & BLOOD 1984, 63(3), 671-675<br><br>--- -/-                                              |                                           |                                                                           |                                    |                                                                                                     |                                                |                                           |                                                                                                   |                                             |                                 |  |                                   |  |                       |                                                                     |                                                              |  |
| Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                |                                           |                                                                           |                                    |                                                                                                     |                                                |                                           |                                                                                                   |                                             |                                 |  |                                   |  |                       |                                                                     |                                                              |  |
| Recherchenort<br>DEN HAAG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                | Abschlußdatum der Recherche<br>19-07-1985 | Prüfer<br>GRIFFITH G.                                                     |                                    |                                                                                                     |                                                |                                           |                                                                                                   |                                             |                                 |  |                                   |  |                       |                                                                     |                                                              |  |
| <table border="0"><tr><td>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN</td><td>E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</td></tr><tr><td>X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet</td><td>D : in der Anmeldung angeführtes Dokument</td></tr><tr><td>Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie</td><td>L : aus andern Gründen angeführtes Dokument</td></tr><tr><td>A : technologischer Hintergrund</td><td></td></tr><tr><td>O : nichtschriftliche Offenbarung</td><td></td></tr><tr><td>P : Zwischenliteratur</td><td>&amp; : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</td></tr><tr><td>T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze</td><td></td></tr></table> |                                                                                                                                                                                                                                                                |                                           |                                                                           | KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN | E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist | X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet | D : in der Anmeldung angeführtes Dokument | Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie | L : aus andern Gründen angeführtes Dokument | A : technologischer Hintergrund |  | O : nichtschriftliche Offenbarung |  | P : Zwischenliteratur | & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument | T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze |  |
| KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist                                                                                                                                                            |                                           |                                                                           |                                    |                                                                                                     |                                                |                                           |                                                                                                   |                                             |                                 |  |                                   |  |                       |                                                                     |                                                              |  |
| X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | D : in der Anmeldung angeführtes Dokument                                                                                                                                                                                                                      |                                           |                                                                           |                                    |                                                                                                     |                                                |                                           |                                                                                                   |                                             |                                 |  |                                   |  |                       |                                                                     |                                                              |  |
| Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | L : aus andern Gründen angeführtes Dokument                                                                                                                                                                                                                    |                                           |                                                                           |                                    |                                                                                                     |                                                |                                           |                                                                                                   |                                             |                                 |  |                                   |  |                       |                                                                     |                                                              |  |
| A : technologischer Hintergrund                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                |                                           |                                                                           |                                    |                                                                                                     |                                                |                                           |                                                                                                   |                                             |                                 |  |                                   |  |                       |                                                                     |                                                              |  |
| O : nichtschriftliche Offenbarung                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                |                                           |                                                                           |                                    |                                                                                                     |                                                |                                           |                                                                                                   |                                             |                                 |  |                                   |  |                       |                                                                     |                                                              |  |
| P : Zwischenliteratur                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument                                                                                                                                                                                            |                                           |                                                                           |                                    |                                                                                                     |                                                |                                           |                                                                                                   |                                             |                                 |  |                                   |  |                       |                                                                     |                                                              |  |
| T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                |                                           |                                                                           |                                    |                                                                                                     |                                                |                                           |                                                                                                   |                                             |                                 |  |                                   |  |                       |                                                                     |                                                              |  |



| EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                           | Seite 2                                   |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|
| Kategorie                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile                                                                                                                                                                                                 | Betrifft Anspruch                         | KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl. 4) |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | CHEMICAL ABSTRACTS, Band 100, Nr. 23, 4. Juni 1984, Seite 383, Nr. 189481e, Columbus, Ohio, US; H.H. SALEM u.a.: "Effects of thrombomodulin and coagulation factor Va-light chain on protein C activation in vitro" & J. CLIN. INVEST. 1984, 73(4), 968-972                         |                                           |                                           |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | ---                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                           |                                           |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | CHEMICAL ABSTRACTS, Band 98, Nr. 7, 14. Februar 1983, Seite 476, Nr. 51411r, Columbus, Ohio, US; W.M. CANFIELD u.a.: "Evidence of normal functional levels of activated protein C inhibitor in combined Factor V/VIII deficiency disease" & J. CLIN. INVEST. 1982, 70(6), 1260-1272 |                                           |                                           |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | ---                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                           | RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl. 4)    |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | CHEMICAL ABSTRACTS, Band 97, Nr. 5, 2. August 1982, Seite 375, Nr. 36731f, Columbus, Ohio, US; R.A. MARLAR u.a.: "Mechanism of action of human activated protein C, a thrombin-dependent anticoagulant enzyme" & BLOOD 1982, 59(5), 1067-1072                                       |                                           |                                           |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | --- -/-                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                           |                                           |
| Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                           |                                           |
| Recherchenort<br>DEN HAAG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Abschlußdatum der Recherche<br>19-07-1985 | Prüfer<br>GRIFFITH G.                     |
| <b>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN</b><br>X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet<br>Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie<br>A : technologischer Hintergrund<br>O : mündliche Offenbarung<br>P : Zwischenliteratur<br>T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze<br>E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist<br>D : in der Anmeldung angeführtes Dokument<br>L : aus andern Gründen angeführtes Dokument<br>& : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument |                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                           |                                           |



| EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                              |                                           |                                              |                                    |                                                                                                      |                                                |                                           |                                                                                                   |                                             |                                 |  |                           |  |                       |                                                                     |                                                              |  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|----------------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|-------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------|--|---------------------------|--|-----------------------|---------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|--|
| Kategorie                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile                                                                                                                                                                          | Betrifft<br>Anspruch                      | KLASSIFIKATION DER<br>ANMELDUNG (Int. Cl. 4) |                                    |                                                                                                      |                                                |                                           |                                                                                                   |                                             |                                 |  |                           |  |                       |                                                                     |                                                              |  |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | BIOLOGICAL ABSTRACTS, Band 69,<br>Nr. 4, Seite 2242, Nr. 21158,<br>Philadelphia, US; W. KISIEL:<br>"Human plasma protein C:<br>Isolation, characterization, and<br>mechanism of activation by<br>alpha-thrombin" & J. CLIN.<br>INVEST., 64(3), 761-769, 1979 |                                           |                                              |                                    |                                                                                                      |                                                |                                           |                                                                                                   |                                             |                                 |  |                           |  |                       |                                                                     |                                                              |  |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | ---<br>US-A-3 980 432 (H. TROBISCH<br>u.a.)                                                                                                                                                                                                                  |                                           |                                              |                                    |                                                                                                      |                                                |                                           |                                                                                                   |                                             |                                 |  |                           |  |                       |                                                                     |                                                              |  |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | ---<br>US-A-3 501 567 (J. CHOAY u.a.)<br><br>-----                                                                                                                                                                                                           |                                           |                                              |                                    |                                                                                                      |                                                |                                           |                                                                                                   |                                             |                                 |  |                           |  |                       |                                                                     |                                                              |  |
| Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                              |                                           | RECHERCHIERTE<br>SACHGEBIETE (Int. Cl. 4)    |                                    |                                                                                                      |                                                |                                           |                                                                                                   |                                             |                                 |  |                           |  |                       |                                                                     |                                                              |  |
| Recherchenort<br>DEN HAAG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                              | Abschlußdatum der Recherche<br>19-07-1985 | Prüfer<br>GRIFFITH G.                        |                                    |                                                                                                      |                                                |                                           |                                                                                                   |                                             |                                 |  |                           |  |                       |                                                                     |                                                              |  |
| <table border="0"><tr><td>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN</td><td>E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</td></tr><tr><td>X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet</td><td>D : in der Anmeldung angeführtes Dokument</td></tr><tr><td>Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie</td><td>L : aus andern Gründen angeführtes Dokument</td></tr><tr><td>A : technologischer Hintergrund</td><td></td></tr><tr><td>O : mündliche Offenbarung</td><td></td></tr><tr><td>P : Zwischenliteratur</td><td>&amp; : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</td></tr><tr><td>T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze</td><td></td></tr></table> |                                                                                                                                                                                                                                                              |                                           |                                              | KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN | E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist | X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet | D : in der Anmeldung angeführtes Dokument | Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie | L : aus andern Gründen angeführtes Dokument | A : technologischer Hintergrund |  | O : mündliche Offenbarung |  | P : Zwischenliteratur | & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument | T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze |  |
| KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist                                                                                                                                                         |                                           |                                              |                                    |                                                                                                      |                                                |                                           |                                                                                                   |                                             |                                 |  |                           |  |                       |                                                                     |                                                              |  |
| X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | D : in der Anmeldung angeführtes Dokument                                                                                                                                                                                                                    |                                           |                                              |                                    |                                                                                                      |                                                |                                           |                                                                                                   |                                             |                                 |  |                           |  |                       |                                                                     |                                                              |  |
| Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | L : aus andern Gründen angeführtes Dokument                                                                                                                                                                                                                  |                                           |                                              |                                    |                                                                                                      |                                                |                                           |                                                                                                   |                                             |                                 |  |                           |  |                       |                                                                     |                                                              |  |
| A : technologischer Hintergrund                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                              |                                           |                                              |                                    |                                                                                                      |                                                |                                           |                                                                                                   |                                             |                                 |  |                           |  |                       |                                                                     |                                                              |  |
| O : mündliche Offenbarung                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                              |                                           |                                              |                                    |                                                                                                      |                                                |                                           |                                                                                                   |                                             |                                 |  |                           |  |                       |                                                                     |                                                              |  |
| P : Zwischenliteratur                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument                                                                                                                                                                                          |                                           |                                              |                                    |                                                                                                      |                                                |                                           |                                                                                                   |                                             |                                 |  |                           |  |                       |                                                                     |                                                              |  |
| T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                              |                                           |                                              |                                    |                                                                                                      |                                                |                                           |                                                                                                   |                                             |                                 |  |                           |  |                       |                                                                     |                                                              |  |